Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 6, Jan.-Feb. 2021, p. 1243-1255

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۹، ص. ۱۲۵۵-۱۲۴۳

مقاله پژوهشی

تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر فعالیت برخی آنزیم‌های منطقه ریزوسفر تحت تنش سرب و کادمیم

سمانه عبداللهی[1]*- احمد گلچین[2]- فاطمه شهریاری[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲

چکیده

به منظور بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر فعالیت آنزیم‌های منطقه ریزوسفر یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید. تیمارها شامل سه رقم کلم، شامل کلم زینتی (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.)، کلم برگ (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) و کلم بروکلی (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) و شش سطح تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه، شامل *Pseudomonas putida* PTCC1694، *Bacillus megaterium* PTCC1656، *Bacillus subtilis* PTCC1715، *Proteus vulgaris* PTCC1079، *Azotobacter chroococcum* و یک تیمار بدون تلقیح بود. به منظور بررسی دقیق‌تر منطقه ریزوسفری از ریزوباکس استفاده و سه عدد نشاء کلم در قسمت مرکزی هر ریزوباکس (منطقه ریزوسفری) کشت گردید. پس از گذشت سه ماه گیاه کلم برداشت و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز در خاک ریزوسفری اندازه‌گیری گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که رقم کلم، گونه باکتری و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<0/01$) بر فعالیت آنزیم‌های منطقه ریزوسفر داشتند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida*، بیش‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* و بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* بود. بر این اساس می‌توان گفت حضور باکتری‌های محرک رشد گیاه در خاک می‌تواند اثرات سمی فلزات سنگین بر گیاه را تعدیل و فعالیت برخی از آنزیم‌های کلیدی برای رشد گیاه در خاک ریزوسفری را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، اوره‌آز، دی‌هیدروژناز، ریزوباکس، فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی

مقدمه

آلودگی خاک و زوال محیط زیست به‌عنوان یک مشکل جدی و چالش برانگیز، مخاطراتی را برای انسان به‌وجود آورده است (۴ و ۲۲). از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین آلاینده‌ها که ورودشان به محیط زیست باعث بروز بیماری‌های مختلف در انسان می‌شود، فلزات سنگین[3] هستند که به‌دلیل ماندگاری بسیار بالا در محیط و عدم تجزیه توسط ریزجانداران خاکزی و امکان ورود به چرخه غذایی[4] انسان از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۳۶). از میان فلزات سنگین، کادمیوم و سرب به‌دلیل سمی بودن برای انسان و گیاه و نداشتن نقش فیزیولوژیک دارای اهمیت خاصی هستند و افزایش غلظت قابل جذب این عناصر در خاک می‌تواند سبب کاهش فعالیت و جمعیت میکروبی، تنوع زیستی میکروبی، تجزیه موادآلی و فعالیت آنزیمی خاک گردد (۴، ۲۲ و ۲۵). لذا بررسی فرایندهای متابولیکی خاک و آنزیم‌های کلیدی در چرخه عناصر غذایی مهم خاک در زمین‌های آلوده به فلزات سنگین بسیار مهم است (۳۳). باکتری‌های محرک رشد گیاه از جمله موجودات زنده در خاک هستند که توانایی تحریک و افزایش فعالیت‌های میکروبی را داشته و فعالیت انواع آنزیم‌ها را در خاک تشدید می‌کنند. بسیاری از این باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی مانند فسفاتاز و فیتاز را دارند (۲۰). فسفاتاز آنزیمی است که از طریق هیدرولیز کردن منواسترهای اسید فسفریک و تبدیل آن‌ها به یون فسفات و مولکولی با یک گروه هیدروکسیل آزاد، گروه فسفات را از پیش ماده (بستره) خود جدا می‌سازد. فسفاتازها در چرخه بیوژئوشیمی فسفر نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۶). فسفاتازهای

---

۱ و ۲- به‌ترتیب دکتری و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: samaneh.abdollahi87@yahoo.com)
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

4- Heavy metals
5- Food chain

درون سلولی که در واکوئل و وزیکول قرار دارند بعد از تخریب غشای سلولی آزاد می‌شوند و به خارج سلول راه می‌یابند، این آنزیم‌ها روی دیواره سلولی ریشه‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت جذب می‌شوند (۵). اگرچه ریشه‌های گیاه در تولید فسفاتازها نقش دارند اما فسفاتازهای میکروبی (قارچ‌ها و باکتری‌ها) در هیدرولیز ترکیبات آلی خاک مؤثرتر هستند (۵۴).

فعالیت‌های آنزیمی در خاک ریزوسفری بیش‌تر از توده خاک (خاک غیر ریزوسفری) است (۶). افزایش فسفر معدنی، کاهش فسفر آلی و افزایش حرکت فسفر از توده خاک به خاک ریزوسفری با افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز ارتباط دارد (۵۴). فعالیت‌های آنزیمی خاک در خاک‌های آلوده به عناصر کمیاب عمدتاً به دلیل تعامل مستقیم بین عناصر کمیاب با مولکول‌های آنزیم یا زیر ساختارهای آنزیم–سوبسترا مهار می‌شود (۵۵). کمبود فسفر در خاک، ترشح آنزیم فسفاتاز اسیدی از ریشه گیاهان را افزایش می‌دهد. این امر سبب افزایش حلالیت و بازتولید فسفر در خاک ریزوسفری شده و به‌طور مؤثری توانایی گیاه برای مقابله با شرایط تنش فسفر را بهبود می‌بخشد (۲۴).

هم‌چنین فعالیت آنزیم‌ها در خاک بستگی به ماهیت پوشش گیاهی دارد (۱۵) و آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی باعث افزایش فسفر آلی و جوانه‌زنی بذر شده و اثر مثبتی بر زیست توده گیاه و مقدار فسفر گیاه دارند (۳۸). جونز و همکاران (۱۷) گزارش کردند که باکتری *Bacillus megaterium* از جمله باکتری‌های محرک رشد گیاه است که توانایی تولید آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی را دارد. آقا بابایی و همکاران (۲) گزارش کردند که آلودگی خاک به کادمیم فعالیت فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز را در خاک به ترتیب ۲۱ تا ۳۰ و ۹ تا ۲۵ درصد کاهش داد. فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز نیز با افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله سرب و کادمیم در خاک به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱). آنزیم اوره‌آز نیز تحت تأثیر نوع خاک، دما، مقدار ماده آلی، شیوه‌های مدیریت خاک، محصول و فلزات سنگین قرار دارد (۶۰). مادر و همکاران (۳۰) نیز گزارش کردند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز سبب بهبود کیفیت خاک می‌شوند. البته مطالعات بسیار کمی درخصوص تأثیر ریزجاندارن بر فعالیت آنزیم‌های خاک ریزوسفری تحت تنش فلزات سنگین انجام شده است. از این‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر تولید برخی آنزیم‌ها در خاک ریزوسفری که تحت تنش فلزات سنگین سرب و کادمیم بودند انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک

خاک مورد استفاده در این آزمایش یک خاک با آلودگی متوسط به فلزات سنگین سرب و کادمیم بود که از موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۲ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۳۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۷ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۴۰ دقیقه طول شرقی (اطراف کارخانه سرب و روی ایران واقع در ۹۰ کیلومتری جنوب غربی استان زنجان مجاور شهر دندی) از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری تهیه و پس از هوا خشک کردن و عبور دادن از الک دو میلی‌متری برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن از قبیل غلظت کل و قابل جذب سرب و کادمیم (۱۹, ۲۹) توسط دستگاه جذب اتمی (Varian Spectra. AA20)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی خاک در عصاره یک به پنج (خاک به آب) (۴۰)، ماده‌آلی خاک (۵۶)، کربنات کلسیم معادل، گچ، غلظت نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم قابل جذب (۴۷) و بافت خاک (۹) اندازه‌گیری گردید (جدول ۱).

طرح و تیمارهای آزمایش

به منظور بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر فعالیت آنزیم‌های منطقه ریزوسفر یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید. تیمارها شامل سه رقم کلم، شامل کلم زینتی (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.)، کلم برگ (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) و کلم بروکلی (*Brassica oleracea* var. *italica* L.)) و شش سطح تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه، شامل *Pseudomonas putida* PTCC1694، *Bacillus megaterium* PTCC1656، *Bacillus subtilis* PTCC1715، *Proteus vulgaris* PTCC1079، *Azotobacter chroococcum* و یک تیمار بدون تلقیح بود. بنابراین تعداد تیمارهای آزمایشی ۱۸ عدد (۳ × ۶) و با لحاظ نمودن سه تکرار در مجموع ۵۴ واحد آزمایشی بود.

کاشت گیاه و اعمال تیمارها

به منظور بررسی دقیق‌تر منطقه ریزوسفری از ریزوباکس استفاده (۶۱) و سه عدد نشاء کلم در قسمت مرکزی هر ریزوباکس (منطقه ریزوسفری) کشت گردید. هر ریزوباکس یک جعبه پلاستیکی حاوی پنج کیلوگرم خاک به طول ۲۰۰، عرض ۱۲۰ و ارتفاع ۲۰۰ میلی‌متر بود که در آن خاک ریزوسفری با استفاده از توری فلزی با منافذ کوچکتر از ۳۷ میکرون از خاک غیرریزوسفری جدا شدند. ایزوله باکتری‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[1] تهیه شد (بجز ایزوله *Azotobacter chroococcum* که از موسسه تحقیقات خاک و آب– کرج– تهیه گردید) و پس از تکثیر به مقدار مورد نیاز مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

1- PTCC - Persian Type Culture Collection

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در مطالعه

Table 1- The physical and chemical properties of the soil used in this study

صفت Property	مقدار Quantity	واحد Unit	صفت Property	مقدار Quantity	واحد Unit
شن (Sand)	55	%	قابلیت هدایت الکتریکی (EC)	0.926	($dS\ m^{-1}$)
سیلت (Silt)	27	%	اسیدیته خاک (pH)	7.69	(1:5)
رس (Clay)	18	%	فسفر قابل جذب (Available P)	12.5	($mg\ kg^{-1}$)
کربن آلی (OC)	0.66	%	پتاسیم قابل جذب (Available K)	240	($mg\ kg^{-1}$)
گچ ($CaSO_4$)	15.24	%	سرب کل (Total Pb)	560	($mg\ kg^{-1}$)
کربنات کلسیم معادل ($CaCO_3$)	13.66	%	سرب قابل جذب (Available Pb)	54	($mg\ kg^{-1}$)
رطوبت مزرعه (FC)	19	%	کادمیم کل (Total Cd)	7	($mg\ kg^{-1}$)
نیتروژن کل (Total N)	0.21	%	کادمیم قابل جذب (Available Cd)	0.62	($mg\ kg^{-1}$)

جدول ۲- برخی ویژگی‌های باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه

Table 2- Characteristics of bacterial species used in this study

گونه باکتریایی Bacterial species	توانایی انحلال فسفات معدنی Phosphate solubilizing	توانایی انحلال پتاسیم Potassium solubilizing	توانایی تثبیت نیتروژن Nitrogen fixation	توانایی احیای سولفات Sulfate reduction	تولید ایندول استیک اسید IAA	تولید سیانید هیدروژن HCN
Proteus vulgaris	−	+	−	+	+	−
Pseudomonas putida	+	−	−	−	−	−
Bacillus subtilis	−	−	−	−	−	+
Bacillus megaterium	−	+	−	−	+	+
Azotobacter chroococcum	−	−	+	−	−	+

+ پاسخ مناسب به صفت مورد مطالعه، − پاسخ نامناسب به صفت مورد مطالعه

+: appropriate response to studied trait, -: lack of appropriate response.

از هر نوع باکتری پای هر بوته و در منطقه ریشه به میزان دو میلی‌لیتر با جمعیت ($cfu\ ml^{-1}$)[۱] ۱۰^۸–۱۰^۷ اضافه شد. شرایط گلخانه از نظر دمایی ۲۰- ۱۵ درجه سانتی‌گراد و طول روشنایی ۱۲- ۱۰ ساعت در روز بود. در طی دوره رشد، ریزوباکس‌ها در فاصله زمانی هر دو روز یکبار توزین و تا رسیدن آن‌ها به وزن نهایی (رطوبت ظرفیت مزرعه) با آب مقطر آبیاری شدند. در نهایت پس از گذشت سه ماه گیاه کلم برداشت و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز به روش‌های زیر در خاک ریزوسفری اندازه‌گیری گردید:

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی[۲]

برای سنجش فعالیت این دو آنزیم، یک گرم خاک در حد رطوبت مزرعه عبور داده شده از الک دو میلی‌متری را داخل ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس یک میلی‌لیتر محلول سوبسترا + چهار میلی‌لیتر محلول بافر کاری (Modified Universal Buffer) (۶/۵= pH برای اندازه‌گیری آنزیم فسفاتاز اسیدی و ۱۱= pH برای اندازه‌گیری آنزیم فسفاتاز قلیایی) به آن‌ها اضافه گردید. پس از بستن درپوش ارلن‌ها، آن‌ها را به آرامی شیک کرده و به مدت یک ساعت در انکوباتور در دمای ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

1- Colony forming unit

2- Acid and alkaline phosphatase

بعد از انکوباسیون، یک میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۵ مولار (برای جلوگیری از پراکنده شدن ذرات رس پس از اضافه کردن سود) + چهار میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار (برای استخراج پی نیترو فنول از خاک) + ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده، پس از هم زدن نمونه‌ها، سوسپانسیون را صاف نموده و مقدار جذب پی‌نیتروفنول (*p*NP) در محلول صاف شده در طول موج ۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CE 292 Digital UV-Visible spectrophotometer) قرائت و برحسب میکروگرم پی‌نیتروفنول بر گرم ساعت بیان گردید (۵۰).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز[1]

برای سنجش فعالیت این آنزیم، پنج گرم خاک در حد رطوبت مزرعه عبور داده شده از الک دو میلی‌متری را داخل ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر تولوئن[2] + ۹ میلی‌لیتر بافر تریس (۰/۰۵ مولار و pH=۹) + یک میلی‌لیتر محلول اوره (۰/۲ مولار) به آن‌ها اضافه گردید. پس از بستن درپوش ارلن‌ها، آن‌ها را به آرامی شیک کرده و به مدت دو ساعت در انکوباتور در دمای ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، ۳۵ میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم ۲/۵ مولار + سولفات نقره (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به نمونه‌ها اضافه گردید. پس از به هم زدن نمونه‌ها، سوسپانسیون حاصل صاف و سپس یک میلی‌لیتر از محلول صاف شده به لوله آزمایش منتقل شد. سپس به هر نمونه نه میلی‌لیتر آب مقطر + پنج میلی‌لیتر معرف اسید بوریک اضافه شد و مقدار جذب آمونیوم (NH_4^+-N) در طول موج ۶۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CE 292 Digital UV-Visible spectrophotometer) قرائت و برحسب میکروگرم آمونیوم بر گرم در دو ساعت بیان گردید (۵۱).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز[3]

برای سنجش فعالیت این آنزیم، پنج گرم خاک در حد رطوبت مزرعه عبور داده شده از الک دو میلی‌متری را داخل ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس پنج میلی‌لیتر محلول سوبسترا + پنج میلی‌لیتر بافر تریس (۰/۱ مولار) به آن‌ها اضافه گردید. پس از بستن درپوش ارلن‌ها، آن‌ها را به آرامی شیک کرده و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، ۲۵ میلی‌لیتر استون به نمونه‌ها اضافه گردید. مجدداً به مدت دو ساعت در تاریکی شیک و سپس در اتاق نیمه تاریک سوسپانسیون حاصل صاف و مقدار جذب تری فنیل فورمازان (TPF) در طول موج ۵۴۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CE 292 Digital UV-Visible spectrophotometer) قرائت و برحسب میکروگرم تری فنیل فورمازان بر گرم در ۱۶ ساعت بیان گردید (۵۱).

1- Urease
2- Toluene
3- Dehydrogenases

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.4 (۴۵)، مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که رقم کلم، گونه باکتری و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد (p<۰/۰۱) بر فعالیت آنزیم‌های منطقه ریزوسفر، شامل آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز داشتند (جدول ۳).

تأثیر رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی

مقایسه میانگین‌های تأثیر رقم کلم بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی نشان داد که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم‌ها (به ترتیب با میانگین‌های ۷۴۲/۷۲ و ۲۶۰/۳۹ میکروگرم پی‌نیتروفنول بر گرم خاک در ساعت) مربوط به رقم کلم برگ بود (شکل ۱-الف). هم‌چنین مقایسه میانگین‌های تأثیر تلقیح خاک با گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی نشان داد که کم‌ترین فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) بود و تلقیح خاک با باکتری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی گردید. به‌طوری که بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی به ترتیب با میانگین‌های ۱۰۹۴/۵۳ و ۴۳۴/۴۵ میکروگرم پی‌نیتروفنول بر گرم خاک در ساعت مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida* بود که به ترتیب ۷/۳ و ۶/۱ برابر نسبت به تیمار شاهدشان افزایش داشتند. باکتری *A. chroococcum* نیز به ترتیب با افزایش ۴/۵ و ۲/۵ برابری فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی در مقام دوم قرار گرفت (شکل ۱-ب). گونه‌های مختلف جنس *Pseudomonas* با تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز سبب افزایش جذب فسفر توسط گیاه می‌شوند (۲۶). مطالعات بسیاری نشان داده است که باکتری *A. chroococcum* به عنوان مایه تلقیح بذر نه تنها در تثبیت نیتروژن بلکه بر سایر خصوصیات از قبیل تولید هورمون‌های رشد (۴۱)، مواد ضد قارچی (۲۸) و سیدروفور (۴۹) مؤثر است.

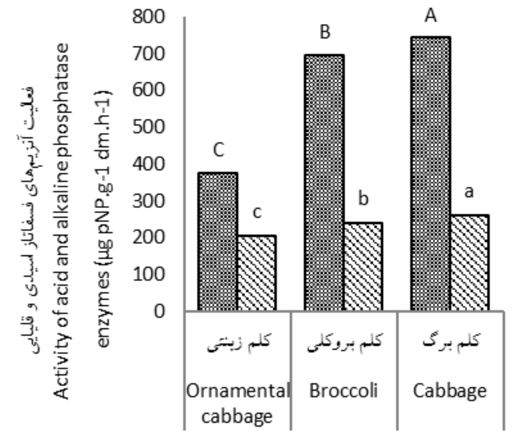
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تأثیر رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های خاک ریزوسفری

Table 3- The Analyses of variance of data showing the effects of cabbage varieties and bacterial species on activity of enzymes of the rhizosphere soil

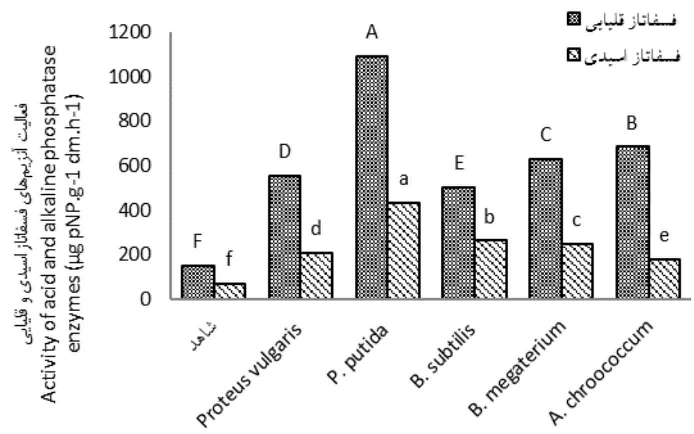
منابع تغییرات Variables	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square			
		فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	اوره‌آز Urease	دی‌هیدروژناز Dehydrogenases
رقم کلم Cabbage varieties	2	722803.24**	14634.42**	3424.96**	2.44**
گونه باکتری Bacterial species	5	841551.09**	128684.73**	24227.16**	37.31**
رقم کلم×گونه باکتری Cabbage varieties × Bacteria species	10	92621.55**	11101.19**	6110.19**	1.29**
خطا Error	36	29.012	62.9602	164.8679	0.06356
ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)	–	0.89	3.38	11.85	6.28

** و * به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار و ns اختلاف معنی‌دار نیست.

** significant at 0.01 level, * significant at 0.05 level, ns not significant.



الف (A)



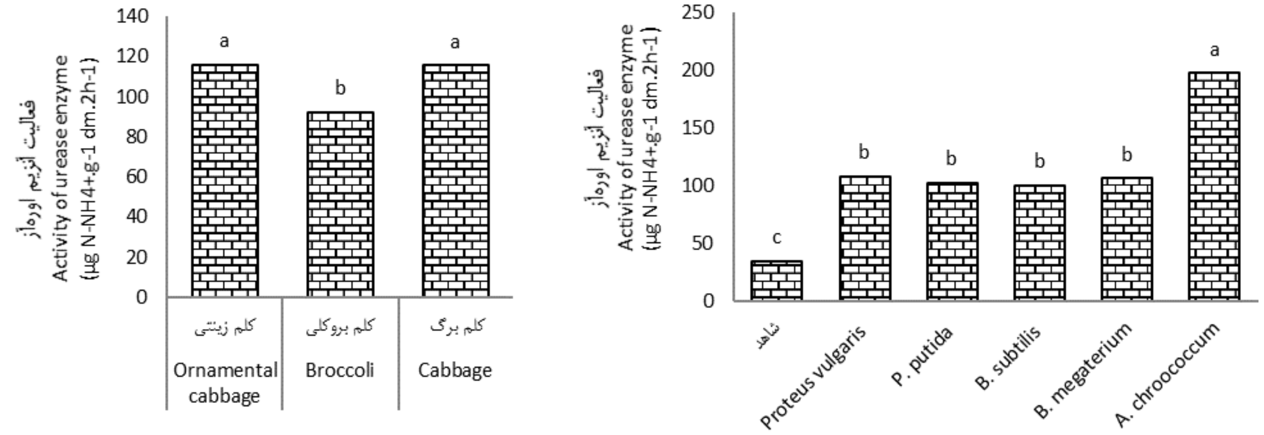
ب (B)

شکل ۱- تأثیر رقم کلم کلم (الف) و گونه باکتری (ب) بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی در خاک ریزوسفری

Figure 1- The main effects of cabbage varieties (A) and bacterial species (B) on activity of alkaline and acid phosphatase enzymes in the rhizosphere soil

تأثیر رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز

نتایج مقایسه میانگین‌های تأثیر رقم کلم بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نشان داد که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم مربوط به رقم‌های کلم زینتی و کلم برگ بود (شکل ۲-الف). هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تلقیح خاک با باکتری سبب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک ریزوسفری گردید. به‌طوری که کم‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) و بیش‌ترین فعالیت آن (با میانگین ۱۹۷/۴۵ میکروگرم $N\text{-}NH_4^+$ بر گرم در دو ساعت) مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* بود که ۵/۷ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت (شکل ۲-ب). مجموعه بررسی‌های انجام شده بیانگر آن است که کارایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن علاوه بر فیزیولوژی باکتری، به گونه گیاهی و شرایط محیطی نیز وابسته است. برخی ایزوله‌های باکتری *A. chroococcum* سبب افزایش مقدار عناصر نیتروژن و فسفر و انتقال آن‌ها از ریشه به بخش هوایی گیاه می‌شوند که دلیل آن را می‌توان به داشتن توانایی تولید آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی و اوره‌آز توسط باکتری (۳۷) و نیز تولید مواد بیولوژیکی مانند ویتامین‌های B، اسیدهای نیکوتینیک، اسید پنتوتنیک، بیوتین، اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و غیره نسبت داد (۲۳).



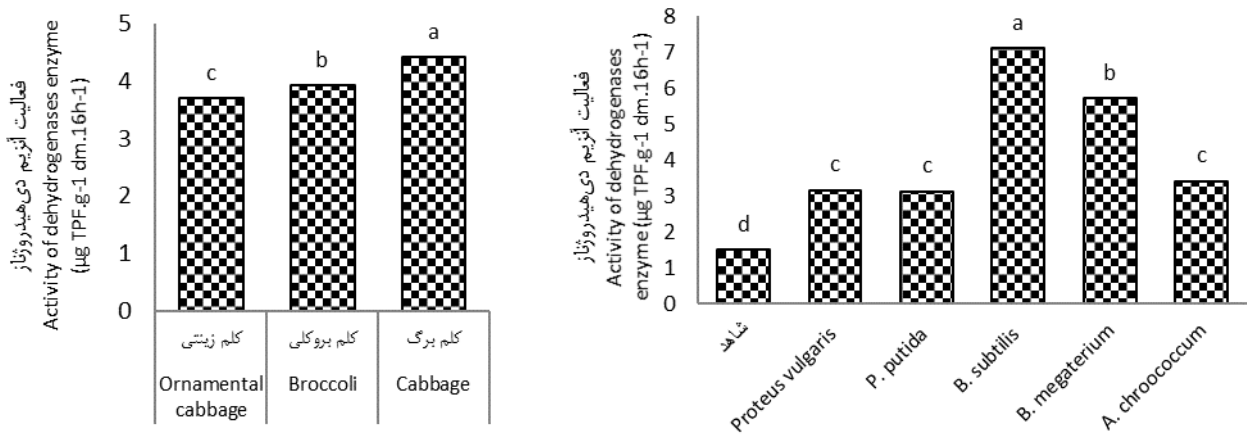
الف (A) ب (B)

شکل ۲- تأثیر رقم کلم (الف) و گونه باکتری (ب) بر فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک ریزوسفری

Figure 2- The main effects of cabbage varieties (A) and bacterial species (B) on activity of urease enzyme in the rhizosphere soil

تأثیر رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز

همان‌طور که در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز با میانگین ۴/۴۲ میکروگرم تری فنیل فورمازان بر گرم خاک در ۱۶ ساعت مربوط به رقم کلم برگ و کم‌ترین فعالیت آن مربوط به رقم کلم زینتی بود (شکل ۳-الف). مقایسه میانگین‌های تأثیر تلقیح خاک با باکتری نیز نشان داد که کم‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) بود و تلقیح خاک با باکتری‌های محرک رشد گیاه فعالیت این آنزیم را افزایش داد. به‌طوری که بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز با میانگین ۷/۱۲ میکروگرم تری فنیل فورمازان بر گرم خاک در ۱۶ ساعت مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* بود که به‌طور میانگین ۴/۷ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. اما فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک‌های ریزوسفری تلقیح شده با باکتری‌های *Proteus vulgaris*، *P. putida* و *A.chroococcum* تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری با یکدیگر نداشتند (شکل ۳-ب). باکتری‌های جنس *Bacillus* با تراوشات و متابولیت‌های ریزوسفری سازگاری داشته (۱۰) و همین امر باعث افزایش جمعیت و فعالیت آن‌ها شده است که در نهایت افزایش فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز را در پی داشته است .



الف (A) ب (B)

شکل ۳- تأثیر رقم کلم (الف) و گونه باکتری (ب) بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک ریزوسفری

Figure 3- The main effects of cabbage varieties (A) and bacterial species (B) on activity of dehydrogenases enzyme in the rhizosphere soil

اثر متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی نشان داد که کم‌ترین فعالیت این آنزیم‌ها در هر سه رقم کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ در خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) به دست آمد و با تلقیح خاک ریزوسفری با باکتری، فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافت. بیش‌ترین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (۱۵۲۹/۲۸ میکروگرم پی‌نیتروفنول بر گرم خاک در ساعت) مربوط به رقم کلم بروکلی و خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida* و بیش‌ترین فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (۴۹۷/۹۲ میکروگرم پی‌نیتروفنول بر گرم خاک در ساعت) مربوط به رقم کلم برگ و خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida* بود (جدول ۴). فسفر یکی از عناصر اصلی برای افزایش عملکرد کلم بروکلی است و سطح پایین فسفر خاک، تولید کمی و کیفی این محصول ارزشمند غذایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۲، ۲۱ و ۳۵). افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک ریزوسفری کلم بروکلی با توجه به نیاز و جذب بالای فسفر توسط این رقم تأیید می‌کند که این آنزیم‌ها در سطح پایین فسفر خاک فعال هستند و فعالیت آن‌ها با سطح فسفر خاک متناسب است. فسفاتازها فسفر خاک را که عمدتاً به صورت پلی‌فسفات وجود دارد، هیدرولیز کرده و باعث آزاد شدن فسفر در خاک و جذب آن توسط ریشه گیاه می‌شوند (۵۳). محققان دیگری نیز افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک زیر کشت کلم بروکلی را گزارش کرده‌اند (۱۴ و ۴۸).

تلقیح خاک ریزوسفری رقم کلم زینتی با باکتری‌های *Proteus vulgaris*، *P. putida*، *B. subtilis*، *B. megaterium* و *A. chroococcum* سبب شد فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به ترتیب ۷، ۹/۵، ۷/۵، ۷/۲ و ۴ برابر و فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی به ترتیب ۳/۲، ۷/۴، ۵/۷، ۵/۵ و ۱/۷ برابر نسبت به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) افزایش یابد (جدول ۴). در رقم کلم بروکلی، میزان افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به ترتیب ۳/۶، ۷/۶، ۴/۳، ۴/۲ و ۴/۱ برابر و افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی به ترتیب ۷/۲، ۱۱/۱، ۷/۶، ۶/۴ و ۴/۲ برابر نسبت به خاک‌های ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) بود (جدول ۴). هم‌چنین در رقم کلم برگ تلقیح خاک ریزوسفری با باکتری‌های ذکر شده در بالا سبب شد فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به ترتیب ۲/۸، ۶/۶، ۴/۲، ۳/۵ و ۲/۷ برابر و فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی به ترتیب ۱/۵، ۳/۹، ۲/۳، ۱/۹ و ۱/۷ برابر نسبت به خاک‌های ریزوسفری تلقیح نشده (شاهدشان) افزایش یابد (جدول ۴).

فعالیت‌های آنزیمی اغلب به‌عنوان اولین و حساس‌ترین شاخص زیست محیطی خاک در شرایط طبیعی و در زیست بوم‌های کشاورزی در نظر گرفته می‌شود (۷). فعالیت آنزیمی با متغیرهای محیطی نظیر رطوبت، دما، میزان ماده آلی، نوع کاربری اراضی و پراکندگی باکتری‌های محرک رشد گیاه تغییر می‌کند (۵۲). از جمله آنزیم‌های خاک می‌توان به آنزیم فسفاتاز اشاره نمود. آنزیم فسفاتاز هیدرولیزکننده استرهای فسفات آلی به ارتوفسفات است. بنابراین بخش مهمی از زنجیره بین فسفر معدنی و آلی را در خاک تشکیل می‌دهد (۴۴). در میان باکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های حل کننده فسفات از طریق ترشح اسیدهای آلی و تولید آنزیم‌های فسفاتاز قابلیت دسترسی فسفر را برای گیاه افزایش می‌دهند (۲۲). آنزیم‌ها نسبت به غلظت‌های بالای عناصر سمی در خاک بسیار حساس هستند (۳۴). آقا بابایی و همکاران (۲) گزارش کردند که آلودگی خاک به کادمیم فعالیت فسفاتاز قلیایی را در خاک ۲۱ تا ۳۰ درصد کاهش داد. اما تحقیقات اندکی درخصوص تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر فعالیت آنزیم‌ها در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین انجام شده است. جونز و همکاران (۱۷) گزارش کردند که باکتری *B. megaterium* از جمله باکتری‌های محرک رشد است که توانایی تولید آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی را دارد.

اثر متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نشان می‌دهد که کم‌ترین فعالیت این آنزیم در هر سه رقم کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ در خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) به دست آمد و با تلقیح خاک ریزوسفری با باکتری‌های محرک رشد فعالیت آن افزایش یافت. بیش‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آز در هر سه رقم کلم برگ، کلم بروکلی و کلم زینتی به ترتیب با میانگین‌های ۲۰۸/۳۶، ۲۰۰/۱۸ و ۱۸۳/۸۲ میکروگرم نیتروژن آمونیومی بر گرم خاک در دو ساعت مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* بود که به ترتیب ۵، ۷/۳ و ۴/۸ برابر نسبت به تیمار شاهدشان (خاک ریزوسفری تلقیح نشده) افزایش داشتند (جدول ۴). نتایج حاصل نشان می‌دهد که در هر سه رقم کلم، خاک‌های ریزوسفری تلقیح شده با باکتری‌های *B. megaterium* و *B. subtilis* در مکان‌های بعدی قرار گرفتند و بعد از خاک‌های ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آز بودند (جدول ۴).

ماکوئی و ناکیدمی (۳۱) با مطالعه عوامل تأثیرگذار بر آنزیم‌های خاک میزان فعالیت آن‌ها را علاوه بر مقدار و نوع ماده آلی به شرایط محیطی مانند نوع خاک، شدت فعالیت موجودات زنده و فرآیندهای زیستی در خاک وابسته دانستند. عناصر سنگین علاوه بر فعالیت موجودات زنده با تغییر شرایط شیمیایی بر فعالیت آنزیم‌ها نیز تأثیر

می‌گذارند. پژوهشگران مختلف تأثیر متفاوتی از فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم اوره‌آز گزارش کرده‌اند. یان و همکاران (۵۹) گزارش کردند که غلظت‌های کم سرب و کادمیم در خاک تأثیری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نداشتند، اما غلظت‌های زیاد آنها اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز داشتند. ستی و گوپتا (۴۶) بیان کردند که کادمیم به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز و دی‌هیدروژناز را کاهش داد. کیزیکایا و همکاران (۲۷)، وانگ و همکاران (۵۸) و صالحیان و همکاران (۴۲) در مطالعه اثر کادمیم بر روی فعالیت آنزیم اوره‌آز بیان کردند که این آنزیم کم‌تر وابسته به آلاینده کادمیم است. آقا بابایی و همکاران (۲) گزارش کردند که آلودگی خاک به کادمیم فعالیت آنزیم اوره‌آز را در خاک ۹ تا ۲۵ درصد کاهش داد. البته مطالعات بسیار کمی درخصوص تأثیر ریزجاندارن بر فعالیت آنزیم در خاک‌های تحت استرس فلزات سنگین انجام شده است. مادر و همکاران (۳۰) گزارش کردند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز و در نهایت بهبود کیفیت خاک گردید.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تلقیح خاک ریزوسفری گیاه کلم با باکتری‌های محرک رشد گیاه در خاک آلوده به فلزات سنگین سرب و کادمیم توانست فعالیت آنزیم اوره‌آز را در خاک ریزوسفری به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) افزایش دهد. با توجه به یکسان بودن شرایط آزمایش برای خاک‌های تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه و خاک شاهد (بدون تلقیح با باکتری)، این افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک ریزوسفری تیمارهای تلقیح شده با باکتری را می‌توان به فعالیت و تأثیر ریزجاندارن بر تولید آنزیم اوره‌آز نسبت داد.

اثر متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک ریزوسفری نشان داد که در هر سه رقم کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ، کم‌ترین فعالیت این آنزیم در خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) به دست آمد و با تلقیح خاک ریزوسفری با باکتری فعالیت آن افزایش یافت. به‌طوری که بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در هر سه رقم کلم برگ، کلم بروکلی و کلم زینتی به ترتیب با میانگین‌های ۸/۷۱، ۶/۷۳ و ۵/۹۳ میکروگرم تری فنیل فورمازان بر گرم خاک در ۱۶ ساعت مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* بود که به ترتیب ۵/۳، ۵/۱ و ۳/۸ برابر نسبت به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) افزایش داشت (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم کلم و گونه باکتری بر فعالیت آنزیم‌های خاک ریزوسفری

Table 4- The interactive effects of cabbage varieties and bacterial species on activity of enzymes of the rhizosphere soil.

رقم کلم Cabbage varieties	گونه باکتری Bacterial species	فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase (μg pNP.g^{-1} dm.h^{-1})	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase (μg pNP.g^{-1} dm.h^{-1})	اوره‌آز Urease (μg N-NH_4^+.g^{-1} dm.2h^{-1})	دی‌هیدروژناز Dehydrogenases (μg TPF.g^{-1} dm.16h^{-1})
کلم زینتی Ornamental cabbage	Control	61.83 o	50.17 k	36.54 jk	1.56 h
	Proteus vulgaris	461.98 j	160.72 h	170.18 bc	3.55 f
	Pseudomonas putida	584.34 h	369.46 c	170.18 bc	3.10 fg
	Bacillus subtilis	250.37 l	285.09 d	55.64 ijk	5.93 cd
	Bacillus megaterium	447.22 k	275.73 d	69.27 ghi	4.84 e
	Azotobacter chroococcum	436.40 k	83.32 j	200.18 ab	3.20 fg
کلم بروکلی Broccoli	Control	154.21 n	38.39 k	22.91 k	1.32 h
	Proteus vulgaris	550.07 i	274.31 d	42.00 ijk	3.15 fg
	Pseudomonas putida	1529.28 a	435.97 b	74.73 gh	3.00 fg
	Bacillus subtilis	632.97 fg	292.82 d	93.82 fg	6.73 b
	Bacillus megaterium	639.70 f	239.32 e	137.45 de	5.88 d
	Azotobacter chroococcum	655.34 e	159.57 h	183.82 ab	3.50 f
کلم برگ Cabbage	Control	231.71 m	124.86 i	44.72 hijk	1.66 h
	Proteus vulgaris	655.31 e	195.64 g	112.91 ef	2.81 g
	Pseudomonas putida	1169.96 b	497.92 a	63.82 ghij	3.30 fg
	Bacillus subtilis	623.63 g	213.51 f	151.09 cd	8.71 a
	Bacillus megaterium	811.08 d	237.19 e	112.91 ef	6.48 bc
	Azotobacter chroococcum	964.65 c	293.20 d	208.36 a	3.55 f

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ($p<0.05$) با هم ندارند.

Different letters indicate significant differences at the 5% probability level.

در رتبه بعدی خاک‌های ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز بودند. به‌طوری که فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک ریزوسفری رقم‌های کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ تلقیح شده با این باکتری به ترتیب ۳/۱، ۴/۵ و ۳/۹ برابر نسبت به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (شاهد) افزایش یافت (جدول ۴).

دی‌هیدروژناز یک آنزیم اکسیدورداکتاز میکروبی و انتقال دهنده هیدروژن است. فعالیت آن وابسته به متابولیسم موجودات زنده در محیط خاک می‌باشد. این آنزیم در درون سلول‌های زنده میکروبی، فرآیندهای اکسایش و کاهش را انجام می‌دهد و مقیاس مناسبی برای فعالیت میکروبی و اندازه‌گیری شدت متابولیسم میکروبی در خاک محسوب می‌شود (۳۲). این آنزیم حساسیت قابل ملاحظه‌ای به آلودگی فلزات سنگین دارد (۴۳). بنابراین بررسی تغییرات آن جهت ارزیابی کیفیت و حاصلخیزی خاک اهمیت زیادی دارد (۱۱). آنزیم دی‌هیدروژناز تحت آلودگی‌های معدنی حاصل از سرب، جیوه و روی کاهش می‌یابد. برهمکنش منفی بین دی‌هیدروژناز و آلودگی ناشی از سرب در خاک مشاهده و گزارش شده است (۱۱ و ۳۹). اثر آلودگی ناشی از فلزات سنگین بر کاهش فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز به‌طور ساختاری مربوط به جلوگیری از اتصال سوبسترا به آنزیم است (۵۲). آکمل و جینمینگ (۳) دریافتند که کاهش فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، ناشی از پیوند فلزات سنگین با گروه‌های عاملی آنزیم است. فلزات سنگین هم‌چنین موجب کاهش فعالیت و جمعیت ریزجانداران خاک می‌گردد. هینسینگر و همکاران (۱۸) نیز بیان کردند که افزایش غلظت فلزات سنگین اثر آنتاگونیستی بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک داشت. شنگ لی و همکاران (۱۰) با مطالعه چند آنزیم دریافتند که برهم‌کنش منفی و معنی‌داری بین فلزات سنگین در خاک و فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز وجود دارد. گزارش شده است که فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز با افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله سرب و کادمیم در خاک به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱). بخش اعظمی از فعالیت آنزیمی تحت تاثیر ریشه قرار دارد، ونگ و همکاران (۵۱) گزارش کردند گیاهانی که زیست توده ریشه بیش‌تری دارند مقدار ترشحات دی‌هیدروژناز و اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین بیش‌تری تولید می‌کنند. دنگ و همکاران (۱۳) بیان کردند که فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز به شدت تحت تأثیر تنش ناشی از فلزات سنگین قرار دارد و با افزایش سطوح آلودگی خاک به فلزات سنگین، فعالیت این آنزیم کاهش می‌یابد. باقری و میرسیدحسینی (۸) تأثیر سطوح مختلف روی بر برخی شاخص‌های زیستی خاک تحت کشت گیاه سورگوم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک آلوده به روی در خاک مجاور ریشه کاهش یافت.

مادر و همکاران (۳۰) گزارش کردند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی سبب افزایش فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز گردید. موسوی (۱۳۹۶) با بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در خاک ریزوسفری گزارش کرد که در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز به‌طور متوسط ۳/۴ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که باکتری‌های محرک رشد گیاه تأثیر معنی‌داری ($p<0/01$) بر فعالیت آنزیم‌های منطقه ریزوسفر، شامل آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی، اوره‌آز و دی‌هیدروژناز داشتند. با توجه به این‌که خاک اولیه مورد استفاده در آزمایش، یک خاک آلوده به فلزات سنگین سرب و کادمیم بود، انتظار می‌رفت که فعالیت آنزیم‌ها در منطقه ریزوسفر کم باشد. اما حضور ریزجاندارن در خاک و تعدیل اثرات سمی فلزات سنگین بر گیاه توانست فعالیت آنزیم‌های تولیدی در خاک ریزوسفری را افزایش دهد. به‌طوری که نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida*، بیش‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* و بیش‌ترین فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز مربوط به خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی خاک در اثر حضور باکتری‌های محرک رشد گیاه از یک سو سبب افزایش رشد و عملکرد گیاه و از سوی دیگر سبب افزایش تحمل گیاه در برابر فلزات سنگین می‌شود که این امر در بحث گیاه پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

1. Abd W.M., Shahin R.R., Khater H.A., and Ali M. 2013. Isolation and identification of heavy-metal resistant soil bacteria. American-Eurasian Journal Of Agricultural and Environmental Sciences 13: 831-838.
2. Aghababaei F., Raiesi F., and Hosseinpur A. 2013. The Influence of Earthworm and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Microbial Biomass Carbon and Enzyme Activity in a Soil Contaminated with Cadmium in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultivation Journal of Water and Soil 27: 949-962.

3. Akmal M., and Jianming X. 2008. Dehydrogenase, urease and phosphatase activities as affected by Pb contamination in the Soil. Soil and Environmental 27: 139-142.
4. Alloway B.J. 1995. Heavy metals in soils, 2nd edn. Blackey Academic and Professional.
5. Aseri G.K., Jain N., and Tarafdar J.C. 2009. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi-arid soils of India. American-Eurasian Journal Of Agricultural and Environmental Sciences 5: 564-570.
6. Badalucco L., Grego S., Dell'Orco S., and Nannipieri P. 1992. Effect of liming on some chemical, biochemical, and microbiological properties of acid soils under spruce (*Picea abies* L.). Biology and Fertility of Soils 14: 76-83.
7. Badiane N.N.Y., Chotte J.L., Pate E., Masse D., and Rouland C. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. Applied Soil Ecology 18: 229-238.
8. Bagheri S. and Mirseyed Hosseini H. 2015. Study of effects of sorghum cultivation on some soil biological indicators at different zinc levels. Journal of Water and Soil 28: 1217-1227.
9. Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agronomy Journal 54: 464-465.
10. Çakmakçı R., Erat M., Erdoğan Ü., and Dönmez M.F. 2007. The influence of plant growth–promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 170: 288-295.
11. Cheng-li C.H., Min L., and Chang-yong H. 2005. Effect of combined pollution by heavy metals on soil enzymatic activies area polluted by tailings from Pb-Zn-Ag mine. Journal of Environmental Sciences 17: 637-640.
12. Demchak K. and Smith C. 1990. Yield responses and nutrient uptake of broccoli as affected by lime type and fertilizer. Journal of the American Society for Horticultural Science 115: 737-740.
13. Deng L., Zeng G., Fan C., Lu L., Chen X., Chen M., Wu H., He X., and He Y. 2015. Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. Applied Microbiology and Biotechnology 99: 8259-8269.
14. Gardner T., Acosta-Martinez V., Senwo Z., and Dowd S.E. 2011. Soil rhizosphere microbial communities and enzyme activities under organic farming in Alabama. Diversity 3: 308-328.
15. Gianfreda L. and Ruggiero P. 2006. Enzyme Activities in Soil. pp. 257-311, Nucleic Acids and Proteins in Soil. Springer.
16. Guimarães L.H.S., Peixoto-Nogueira S.C., Michelin M., Rizzatti A.C.S., Sandrim V.C., Zanoelo F.F., Aquino A.C.M., Junior A.B., and Polizeli M.d.L. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology 37: 474-480.
17. Gunes A., Karagoz K., Turan M., Kotan R., Yildirim E., Cakmakci R., and Sahin F. 2015. Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. Research journal of soil biology 7: 28-45.
18. Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., and Wenzel W.W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytologist 168: 293-303.
19. Hseu Z.Y. 2004. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. Bioresource Technology 95: 53-59.
20. Hübel F. and Beck E. 1993. In-situ determination of the P-relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. Plant and Soil 157: 1-9.
21. Islam M., Shaheb M., Rahman S., Ahmed B., Islam A., and Sarker P. 2010. Curd yield and profitability of broccoli as affected by phosphorus and potassium. International Journal of Sustainable Crop Production 5: 1-7.
22. Jalil A., Selles F., and Clarke J.M. 1994. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. Journal of Plant Nutrition 17: 1839-1858.
23. Kader M.A., Mian M.H., and Hoque M.S. 2002. Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. International Journal of Biological Sciences 2: 259-261.
24. Kai M., Takazumi K., Adachi H., Wasaki J., Shinano T., and Osaki M. 2002. Cloning and characterization of four phosphate transporter cDNAs in tobacco. Plant Science 163: 837-846.
25. Karaca A., Naseby D.C., and Lynch J.M. 2002. Effect of cadmium contamination with sewage sludge and phosphate fertiliser amendments on soil enzyme activities, microbial structure and available cadmium. Biology and Fertility of Soils 35: 428–434.
26. Khan A., Jilani G., Akhtar M.S., Saqlan Naqvi S., and Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. Agricultural biology Science 1: 48-58.
27. Kızılkaya R., Aşkın T., Bayraklı B., and Sağlam M. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. European Journal of Soil Biology 40: 95-102.
28. Lakshminarayana K. 1993. Influence of Azotobacter on Nitrogen Nutrition of Plants and Crop Productivity. Proceedings of the Indian National Science Academy Part B Biological Sciences 3-4: 303-308.
29. Lindsay W.L. and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42: 421-428.
30. Mäder P., Kaiser F., Adholeya A., Singh R., Uppal H.S., Sharma A.K., Srivastava R., Sahai V., Aragno M., and

Wiemken A. 2011. Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat–rice and wheat–black gram rotations in India. Soil Biology and Biochemistry 43: 609-619.
31. Makoi J.H. and Ndakidemi P.A. 2008. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. African Journal of Biotechnology 7: 181-191.
32. Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B., Bollag J.M., and Stotzky G. 1990. Ecological Significance of the Biological Activity in Soil. pp. 293-355, in: Bollag J.M. and Stozky G. (Ed.), Soil biochemistry, vol.6.
33. Naseby D.C. and Lynch J.M. 1998. Impact of wild type and genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on soil enzyme activities and microbial population structure in the rhizosphere of pea. Molecular Ecology Notes 7: 617–625.
34. Norwood W.P., Borgmann U., Dixon D.G., and Wallace A. 2003. Effect of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. Human and Ecological Risk Assessment 9: 795–811.
35. Ouda B.A. and Mahadeen A.Y. 2008. Effect of fertilizers on growth, yield, yield components, quality and certain nutrient contents in broccoli (*Brassica oleracea*). International Journal of Agriculture and Biology 10: 627-632.
36. Papa S., Bartoli G., Pellegrino A., and Fioretto A. 2010. Microbial activities and trace element contents in an urban soil. Environmental Monitoring and Assessment 165: 193-203.
37. Parmar P. and Sindhu S.S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. Journal of Microbiology Research 3: 25-31.
38. Pilar M.C., Ortega N., Perez-Mateos M., and Busto M.D. 2009. Alkaline phosphatase− polyresorcinol complex: characterization and application to seed coating. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 1967-1974.
39. Qu J., Ren G., Chen B., Fan J., and Yong E. 2011. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. Environmental Monitoring and Assessment 182: 597-606.
40. Rayment G.E. and Lyons D.J. 2011. Soil Chemical Methods: Australasia. pp. 512, vol.3. CSIRO publishing
41. Remus R., Ruppel S., Jacob H.-J., Hecht-Buchholz C., and Merbach W. 2000. Colonization behaviour of two enterobacterial strains on cereals. Biology and Fertility of Soils 30: 550-557.
42. Salehian A., Kasraian A., and Vessal M. 2017. The effect of cadmium on soil respiration, urease activity and nitrification in a vermicompost-enriched calcareous soil over time. Journal of Soil Biology 5: 137-147.
43. Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Q., Daae F.L., Castberg T., and Hahn D. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiology Ecology 30: 237–251.
44. Sarikhani M. and Malboobi M.a. 2010. Phytases: enzymology, molecular and biochemical characteristic and applications. Agricultural Biotecnology Journal 2: 13-40.
45. SAS Institute Inc. 1990. Output delivery system: User's guide. SAS institute.
46. Sethi S. and Gupta S. 2015. Responses of soil enzymes to different heavy metals. Biolife 3: 147-153.
47. Sparks D.L., Page A., Helmke P., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., and Sumne M.E. 1996. Methods of Soil Analysis, part 3: Chemical Methods, vol.14. John Wiley & Sons, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA
48. Speir T. and Ross D. 1975. Effects of storage on the activities of protease, urease, phosphatase, and sulphatase in three soils under pasture. New Zealand Journal of Soil Science 18: 231-237.
49. Suneja S., Narula N., Anand R., and Lakshminarayana K. 1996. Relationship of*Azotobacter chrooccum* siderophores with nitrogen fixation. Folia Microbiologica 41: 154-158.
50. Tabatabai M.A. and Bremner J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry 1: 301-307.
51. Tabatabai M.A. and Bremner J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry, 4: 479-487.
52. Tabatabai M.A. 1994. Soil enzymes. pp. 775–833, in: Weaver R.W. (Ed.), Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. . SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI.
53. Tanwar A., Aggarwal A., and Parkash V. 2014. Effect of bioinoculants and superphosphate fertilizer on the growth and yield of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 42: 288-302.
54. Tarafdar J.C. and Jungk A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. Biology and Fertility of Soils 3: 199-204.
55. Tyler G., Pahlsson A.M.B., Bengtsson G.E., Baath E., and Tranvik L. 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. Water, Air, and Soil Pollution 47: 189-215.
56. Walkley A. and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-38.
57. Wang Y., Fang L., Lin L., Luan T., and Tam N.F. 2013. Effects of low molecular-weight organic acids and dehydrogenase activity in rhizosphere sediments of mangrove plants on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Chemosphere 13: 6365-6345.
58. Wang Y.P., Shi J.Y., Wang H., Lin Q., Chen X.C., and Chen Y.X. 2007. The influence of soil heavy metals

pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 75-81.
59. Yan J., Quan G., and Ding C. 2013. Effects of the combined pollution of lead and cadmium on soil urease activity and nitrification. Procedia Environmental Sciences 18: 78-83.
60. Yang Z.-x., Liu S.-q., Zheng D.-w., and Feng S.-d. 2006. Effects of cadium, zinc and lead on soil enzyme activities. Journal of Environmental Sciences 18: 1135-1141.
61. Youssef R.A. and Chino M. 1988. Development of a new Rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. Soil Science and Plant Nutrition 34: 461-465.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 6, Jan.-Feb. 2021, p. 1243-1255

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۹، ص. ۱۲۵۵-۱۲۴۳

The Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the Activity of some Enzymes in Rizosphere Soils under Lead and Cadmium Stress

S. Abdollahi[1*]- A. Golchin[2]- F. Shahryari[3]
Received: 17-02-2020
Accepted: 23-09-2020

Introduction: Contamination of soils with heavy metals is one of the most serious environmental problems increasing the risk of the entry of heavy metals into food chains. Rhizosphere soil is distinct from the bulk soil and is defined as the volume of soil around living roots which is influenced by root activities. Enzymes are produced by both roots and soil microorganisms to alter nutrient availability in rhizosphere soil. Soil enzymes promote the transformation of matter and energy in the soil, and their activity has a close relationship with soil nutrient availability. Detection of microbial enzymes in a natural environment is important to understand biochemical activities and to verify the biotechnological potential of microorganisms. However, there are few reports to indicate the biotechnological potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on the activity of bacterial enzymes in rhizosphere soils under the stress of heavy metals. Thus, in the present study lead and cadmium contaminated rhizosphere soils were inoculated with PGPR species to investigate the influence of these bacteria on the activity of some enzymes.

Materials and Methods: A factorial pot experiment with completely randomized design base and three replications was performed in the greenhouse conditions. The factors examined were (a) rhizosphere soils of three varieties of cabbage [*Brassica oleracea* var. *acephala* L. (Ornamental cabbage), *Brassica oleracea* var. *italica* L. (Broccoli cabbage) and *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (Cabbage)] and (b) five species of PGPR, consisting *Pseudomonas putida* PTCC 1694, *Bacillus megaterium* PTCC 1656, *Proteus vulgaris* PTCC 1079, *Bacillus subtilis* PTCC 1715 and *Azotobacter chroococcum*, used to inoculate the rhizosphere soils. There was also a control treatment (without rhizobacteria). The experiment had 18 treatments and there were 54 experimental units. To study rhizosphere soils, several rhizoboxes were used and three seedlings of cabbage were planted in the central part of each rhizobox (rhizosphere area). In treatments inoculated with rhizobacterial species, 2 ml of a bacterial suspension with 10^7-10^8 (cfu ml^{-1}) was used to inoculate the soil of rootzone. After three months, cabbage varieties were harvested and the activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase, urease, and dihydrogenase were measured in rhizosphere soils. The data obtained from this study were statistically analyzed by SPSS statistical software package (Version 9.4) and the variance of the data was analyzed by one-way ANOVAs (Duncan's test) range test at 1 and 5 percent probability levels.

Results and Discussion: The analysis of variance of the data (ANOVA) showed that the cabbage varieties, inoculation with PGPR species and their interactions had significant effects ($p<0.01$) on the activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase, urease, and dihydrogenase in rhizosphere soils. The results showed that inoculation of the rhizosphere soils with PGPR species increased the activity of soil enzymes. The highest activity of alkaline phosphatase (1529.28 µg $pNP.g^{-1}$ $dm.h^{-1}$) was measured in rhizosphere soils of the broccoli inoculated with *Pseudomonas putida* PTCC 1694. But, the highest activity of acid phosphatase (497.92 µg $pNP.g^{-1}dm.h^{-1}$) was obtained in rhizosphere soils of cabbage inoculated with *Pseudomonas putida* PTCC 1694. Also, the highest activity of urease (208.36 µg $N\text{-}NH_4^+.g^{-1}dm.2h^{-1}$) was observed in rhizosphere soils of the cabbage inoculated with *Azotobacter chroococcum* and the highest activity of dihydrogenase (8.71 µg $TPF.g^{-1}dm.16h^{-1}$) was observed when rhizosphere soils of the cabbage were inoculated with *Bacillus subtilis* PTCC1715.

Conclusion: From the results of this study, it may be concluded that inoculation of Pb and Cd contaminated soils with PGPR species could modulate the toxic effects of heavy metals on plant and increase the activity of some key enzymes for plant growth in rhizosphere soils.

Keywords: Acid phosphatase, Alkaline phosphatase, Enzyme, Dihydrogenase, Rhizobox, Urease

---

1 and 2- Ph.D. and Professor, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, respectively.
(*- Corresponding Author Email: samaneh.abdollahi87@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
DOI: DOI: 10.22067/jsw.v34i6.85576